

# Indice

<b>ELENCO DEI COLLABORATORI</b>	<b>2</b>
<b>RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUZIONE (max 5 pagine)</b>	<b>3</b>
<b>2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)</b>	<b>6</b>
2.1 Campionamento . . . . .	6
2.2 Esami microbiologici . . . . .	6
2.3 Antibigrammi . . . . .	6
2.4 Analisi metagenomiche . . . . .	7
2.5 Analisi dei dati . . . . .	7
<b>3 RISULTATI</b>	<b>9</b>
3.1 QUADRO GENERALE . . . . .	9
3.2 PREVALENZA DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI E MULTI-RESISTENTI NELLA FAUNA SELVATICA . . . . .	10
3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISO- LATI BATTERICI . . . . .	12
3.4 POOL METAGENOMICI . . . . .	13
<b>4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)</b>	<b>14</b>
<b>5 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>15</b>
<b>6 Raccomandazioni (max 2 pagine)</b>	<b>16</b>
<b>7 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)</b>	<b>16</b>

## Elenco delle figure

1 Comuni di provenienza dei campioni . . . . .	17
2 distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici . . . . .	18

## Elenco delle tabelle

1	Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni . . . . .	18
2	Distribuzione del numero e percentuale % del differenti specie di fauna selvatica di origine dei campioni di feci . . . . .	19

## ELENCO DEI COLLABORATORI

- **Dr. Tranquillo Vito** U.O. 1-Responsabile scientifico del progetto.Coordinamento delle U.O., Analisi statistica dei dati fenotipici.
- **Dr. Fiocchi Alfredo** U.O. 1-Analisi microbiologiche e antibiogrammi.
- **Dr. Pongolini Stefano** U.O. 2-Coordinamento U.O. e attività di analisi metagenomiche
- **Dr. Bolzoni Luca** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche e analisi dati
- **Dr. Erika** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche e analisi dati
- **Dr. Bertoletti Irene** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Alessandro Bianchi** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Loris Alborali** U.O. 4-Analisi genomiche ceppi Ceftiofur resistenti
- **Dr. Prati Paola** U.O. 5- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi
- **Dr. Gianni Sala** U.O. 6- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi

# RELAZIONE FINALE VERSIONE INTEGRALE

## 1 INTRODUZIONE (max 5 pagine)

L'Antibiotico-Resistenza (AR) è una grave minaccia per la salute umana, in quanto compromette la capacità di trattare le infezioni. La resistenza agli antibiotici si sviluppa attraverso complessi meccanismi come la mutazione sotto la pressione selettiva derivante dall'uso/abuso di antibiotici in medicina umana e veterinaria, o frequentemente da acquisizione di geni che si sono evoluti nel corso del tempo nei batteri nell'ambiente. Il serbatoio di geni di resistenza nell'ambiente è un mix di resistenza naturale e quella presente nelle deiezioni di animali e uomini, a cui si possono aggiungere gli effetti selettivi di inquinanti, che possono co-selezionare elementi genetici mobili che trasportano più geni di resistenza. L'interesse per il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni, con un costante aumento della produzione scientifica. La principale preoccupazione nasce dal timore che l'eventuale dimostrazione di un ruolo della fauna selvatica come "serbatoio" e "mantenimento" di batteri portatori di geni di resistenza, contribuendo alla contaminazione ambientale di batteri resistenti o materiale genetico di resistenza (resistoma), possa compromettere gli sforzi messi in atto, soprattutto in questi ultimi anni, in campo medico e veterinario per ridurre la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici.

La presenza nella fauna selvatica, normalmente non sottoposta a trattamenti antibiotici, di ceppi batterici resistenti e in generale di geni di resistenza, è opinione comune sia da attribuire a fenomeni di contaminazione ambientale, oltre a noti fenomeni di resistenza naturale di ceppi batterici come strumento di difesa nei confronti di antibatterici prodotti da diversi generi di microrganismi come funghi, lieviti, ecc. Per definire il ruolo della fauna selvatica nel complesso meccanismo di diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza è necessario acquisire informazioni relativamente alla prevalenza di animali selvatici portatori di ceppi batterici resistenti nelle differenti specie e come questa varia in base all'etologia ed ecologia delle specie ospite. La caratterizzazione fenotipica e genotipica dei batteri isolati da specie selvatiche e la prevalenza di ceppi resistenti e multiresistenti. La necessità di colmare le evidenze scientifiche di questo tipo ha portato ad un incremento di studi sull'argomento, comportando nell'arco di una decina d'anni l'accumulo di evidenze che aiutano a definire meglio il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza.

Una "scoping review" (cit[xxxx]) pubblicata nel 2015, ha evidenziato la presenza di 866 articoli di ricerca primaria; Oltre il 90% erano studi osservazionali; la maggioranza riportano i dati di prevalenza per AR nella fauna selvatica (551/866, 63.6%). Ci sono stati 176 di 866 (20,3%) studi di genotipizzazione. AR è stata più frequentemente studiata in *E. coli* 150 di 866 (17,3%), *Salmonella* 83 di 866 (9,6%) e *Enterococcus* 48

di 866 (5,5%). I gruppi della fauna selvatica più frequentemente studiati erano uccelli 410 su 866 (47,3%), cervidi, 133 di 866 (15,4%) e roditori 91 di 866 (10,5%). Solo 11 articoli hanno studiato la contaminazione dei prodotti, e ci sono stati 26 casi di vettori intermedi, come le mosche o insetti. La contaminazione ambientale è stata più frequentemente riportata per l'acqua 130 di 866 (15%). Le modalità di trasmissione dell'AR è stata riportata in 110 articoli (12,7%). Tra le caratteristiche ambientali che sono state segnalate come fattori di rischio per il trasferimento di batteri patogeni e /o AR vi sono: condivisione di ambienti 161 di 866 (18,6%), infestazione o mancanza di controllo degli uccelli selvatici 124 di 866 (14,3%) e delle fonti idriche condivise 98 di 866 (11,3%). Le pratiche di mitigazione, strategie o programmi per ridurre la trasmissione di batteri e / o AR sono stati discussi o studiati in 124 su 866 (14,3%) articoli. Sono state fornite informazioni circa i tassi di contatto tra fauna selvatica e animali domestici in 29 articoli (3,3%). È interessante notare che numerosi articoli di ricerca primaria (122/866, 14,1%) hanno riportato associazioni per i fattori di rischio di trasmissione di AR o batteri patogeni dalla fauna selvatica agli animali cibo, fonti ambientali o umani.

Nonostante il crescente interesse e la produzione di un notevole accumulo di evidenze circa la presenza di ceppi antibiotico-resistenti nella fauna selvatica in tutto il mondo e in un'ampia varietà di specie animali non è ancora ben chiaro il ruolo epidemiologico del comparto selvatico nel mantenimento e diffusione dell'antibiotico resistenza. A questo proposito PincoPallino (citare) sottolinea quali sono i gap che la ricerca deve ancora colmare. In particolare....

Uno dei primi lavori in Italia sull'AR nella fauna selvatica è stato condotto da Caprioli et al:(cit) su 81 campioni di feci da mammiferi selvatici (ruminanti, Marmotta) del Parco Nazionale dello Stelvio. Lo studio è stato focalizzato solo su *Escherichia coli* come microrganismo target. Sono stati osservati ceppi AR di *E.coli* in 17 dei 121 ceppi presi in esame. I ceppi isolati hanno mostrato un profilo di multiresistenza. Gli Autori hanno concluso che i ceppi di *E. coli* in animali selvatici possono essere resistenti a diversi agenti antimicrobici e portatori di plasmidi R, anche se il microbioma intestinale degli animali selvatici non è direttamente esposta agli antibiotici. Così una possibile fonte di AR in *E.coli* potrebbe essere quegli esseri umani e animali domestici che portano AMRB e condividono gli stessi habitat (turisti, animali domestici pascolo) di animali della fauna selvatica.

Più recentemente sono stati pubblicati nuovi lavori che riguardano la presenza di antibiotico-resistenza in feci di animali selvatici in varie regioni d'Italia con particolare riferimento alle Enterobatteriacee e in particolare *E.coli* come microrganismo target. (citare gli articoli)

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è stato quello di raccogliere informazioni sulla presenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici della famiglia delle Enterobacteriacee isolati da feci di un ampio

spettro di specie di fauna selvatica, presente in varie province della Lombardia con differenti gradi di urbanizzazione e la caratterizzazione fenotipica del profilo di resistenza dei ceppi isolati e quella genotipica utilizzando metodiche di analisi metagenomica di pool di ceppi batterici.

## **2 MATERIALE E METODI (max 10 pagine)**

### **2.1 Campionamento**

Si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili) , sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano CWD (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gazze). I campioni di feci raccolti dall'intestino degli animali sono stati stoccati a temperatura di congelamento in attesa di essere processati.

### **2.2 Esami microbiologici**

L'esame batteriologico è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nel metodo di prova interno IZSLER che descrive la tecnica microbiologica per la categorizzazione di isolati batterici aerobi/anaerobi facoltativi. I campioni di feci confezionati in sacchetti o barattoli o prelevati direttamente in sede necroscopica dall'intestino, sono stati disciolti in brodo di pre-arricchimento APT (acqua peptonata) e, dopo l'allestimento di tamponi, sono stati seminati su MC-Conkey Agar (terreno selettivo per enterobatteriacee) e incubati per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi al fine di ottenere colonie isolate. Da una colonia isolata sono state realizzate colture su terreno solido Klieger Iron Agar (KIA) da utilizzare nelle successive prove di caratterizzazione (morfologica, colturale, biochimica). Il KIA costituisce un terreno differenziale impiegato principalmente come ausilio nell'identificazione di alcuni membri della famiglia delle Enterobacteriaceae. La differenziazione degli enterobatteri avviene in base alla loro capacità di fermentare il destrosio ed il lattosio e di produrre idrogeno solforato. Tutti i campioni sono stati successivamente sottoposti alla prova della citocromo ossidasi. Quelli risultanti ossidativi e fermentativi alla coltura su terreno Klieger sono stati testati per confermare fossero E.Coli (ossidasi negativo). I campioni risultati ossidasi positivi sono stati invece identificati con analisi biochimica mediante gallerie utilizzando il kit Microgen TM GnA + B-ID System.

### **2.3 Antibigrammi**

Gli antibiogrammi sono stati eseguiti mediante la "tecnica di diffusione in agar" descritta nel metodo di prova interno per l'esecuzione dell'antibiogramma dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, redatto in conformità con le linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). E' stato utilizzato un panel di 7 antibiotici scelti sulla base delle Linee Guida per l'interpretazione delle prove di

sensibilità ai chemioantibiotici del Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico-resistenza. Le molecole selezionate sono indicate come molecole prototipo rappresentative delle diverse classi farmacologiche:

Ampicillina (AMP). Molecola prototipo di Beta-lattamici tipo Amoxicillina, Etacillina. Antibiotico classificato come Critical I. . . . dal. . .

Tetraciclina (TET). Molecola prototipo di Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina, classificato come H I dal. . .

Ceftiofur (CFT). Molecola prototipo di Cefalosporine a spettro esteso come Cefoperazone, Cefpodoxime e Cefquinome, classificate come CIA e HPCI. . . . .

Colistina (COL). Molecole non appartenente al panel consigliato dalla linee guida in quanto particolarmente critico per l'utilizzo in umana. . . e' stato inserito nel panel per verificare la presenza di resistenza a questo importante antibiotico in ceppi provenienti dalla fauna selvatica come misura del grado di contaminazione degli ambienti selvatici da parte di ceppi portatori di resistenza . . . . .

Kanamicina (KAN). Molecola prototipo delle streptomicine quali Neomicina, Framicetina, classificata come CIA. . . .

Enrofloxacin (ENR). Molecola prototipo dei fluorochinolonic, tra cui Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin. Antibiotici classificati come CIA e HPCI

Gentamicina (GEN). Molecola prototipo di streptomicine quali Tobramicina, Apamicina, calssificata come CIA. . . . .

## 2.4 Analisi metagenomiche

Le analisi metagenomiche sono state eseguite sui seguenti pools di ceppi di *Escherichia coli* costituiti secondo criteri di confrontabilità e rappresentatività di, area di campionamento, specie di provenienza, e in base alla disponibilità numerica; un ulteriore pool è costituito da ceppi di *Klebsiella pneumoniae* di particolare interesse come patogeno nosocomiale:

## 2.5 Analisi dei dati

I dati raccolti sono stati inseriti in foglio di lavoro denominato AMR in formato googlesheet e quindi importato in ambiente R (R-CRAN) per le successive analisi. AMR risulta costituito da 978 righe e 23 colonne. Si è proceduto ad eliminare 54 righe relative a campioni per i quali non è stato possibile isolare alcun ceppo. Il dataset finale contiene quindi le informazioni relative a 924 ceppi batterici isolati da campioni di feci

di diverse specie di fauna selvatica. Complessivamente non è stato possibile l'identificazione di genere per 14 ceppi di Enterobacteriacee. AMR contiene i seguenti Per le analisi sulle caratteristiche territoriali delle aree campionate è stato utili MR-924: che contiene tutti i ceppi isolati su terreno McConkey è come tali appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee indipendentemente da AMR-911: che contiene tutti i ceppi di Enterobacteriacee identificati per genere



## 3 RISULTATI

### 3.1 QUADRO GENERALE

#### 3.1.1 Territorio

L'attività di campionamento si è svolta tra Settembre 2017 e Dicembre 2019 in sette province della Lombardia : Bergamo, Pavia, Varese, Como, Lecco e Brescia da un totale di 224 comuni (Fig1). Sulla base dei criteri di classificazione dei comuni adottati dall'ISTAT, in merito a grado di urbanizzazione, e montanità risulta che : 415 campioni (57%) provengono da comuni a bassa urbanizzazione (aree rurali scarsamente popolate), 222 campioni (30%) da comuni a densità intermedia di popolazione e 11 campioni (1.15%) da comuni ad alta densità di popolazione; 472 campioni (65%) provengono da comuni totalmente montani, 162 (22%) da comuni in pianura e 14 campioni (2%), da aree parzialmente montane (collinari). In tabella 1 sono riportate le statistiche descrittive della caratterizzazione geografica e di popolazione dei comuni da cui provengono i campioni.

#### 3.1.2 Fauna selvatica

Sono stati raccolti complessivamente 729 campioni di feci da 33 differenti specie di fauna selvatica. Le specie più frequentemente campionate sono il Capriolo (*Capreolus capreolus*) con 201 campioni ( 27.6%), la Cornacchia grigia (*Corvus cornix*) con 133 (18.2%), il Cervo (*Cervus elaphus*) , con 83 campioni (11.4%), il Cinghiale (*Sus scrofa*) con 78 campioni (10.7%), il Camoscio (*Rupicapra rupicapra*) 49 campioni (6.7%) e il Muffone (*Ovis aries musimon*) 44 campioni (6.0%) che rappresentano complessivamente l'80% dei campioni esaminati. Il restante 20% è distribuito su un totale di 27 specie differenti (tabella 2). -distribuzione territoriale dei gruppi specie (usare ARM-istat IDcamp filtrati. . . ) Oltre il 90% di campioni dei gruppi-specie CERVIDI, BOVIDI e SUIDI proviene da territori classificati da ISTAT come Totalmente Montani (TM); il 75% dei campioni del gruppo CARNIVORI proviene da territori TM; l'86% dei campioni del gruppo CORVIDI proviene da territori Non Montani (NM) e il 50% dei campioni del gruppo RAPACI proviene da territori TM e il 50% da territori NM. Per tutti i gruppi specie risulta poco rappresentata la categoria territoriale Parzialmente Montano (tabella 2b) ISTAT sulla base della densità di popolazione per Km<sup>2</sup> classifica i comuni in 3 classi di urbanizzazione: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale). La distribuzione dei campioni dei diversi gruppi specie rispetto alle caratteristiche di urbanizzazione dei comuni di provenienza riflette quanto già visto per la montanità dei territori campionati, con una più alta frequenza di campioni provenienti da territori rurali e a densità media che da comuni ad elevata densità di popolazione. In particolare dai territori a bassa urbanizzazione (rurali) proviene il 72% dei campioni del

gruppo CERVIDI, il 75% dei campioni del gruppo BOVIDI, il 67% dei campioni del gruppo SUIDI, il 70% dei campioni del gruppo CARNIVORI, il 57% dei campioni dal gruppo CORVIDI e il 30% dal gruppo RAPACI (tabella 2c)

### **3.1.3 Esami microbiologici**

Complessivamente sono stati isolati 978 ceppi batterici, di cui 911 identificati come appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee. *Escherichia coli* (E.coli) rappresenta il 67.6% dei ceppi isolati, il restante 32% dei ceppi è distribuito su un totale di 14 generi differenti ( tabella 3). Per 67 ceppi non si è giunti all'identificazione basata sulle prove biochimiche di genere. Per questi ceppi non si è proceduto ad ulteriori approfondimenti diagnostici ma sono stati comunque archiviati in glicerolo e congelatore.

### **3.1.4 Antibigrammi**

Sono stati eseguiti 910 antibiogrammi. Complessivamente 392 ceppi (43%) sono risultati Suscettibili (S) al panel di antibiotici testati ; 423 (46%) i ceppi Resistenti (R) fino ad un massimo di 2 antibiotici e infine 95 (10%) ceppi sono risultati Multiresistenti (MR), con resistenza a 3 o più antibiotici. La distribuzione del numero di resistenze al panel di antibiotici per isolato (Antibiogram length) mostra una decisa distribuzione asimmetrica (fig.2-hist).

## **3.2 PREVALENZA DI CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI E MULTI-RESISTENTI NELLA FAUNA SELVATICA**

Complessivamente su 670 campioni di feci di fauna selvatica da cui è stato isolato almeno un ceppo di Enterobacteriacee e su cui è stato eseguito l'antibiogramma, 421 hanno almeno un ceppo resistente ad uno o più antibiotici del panel indagato, pari ad una Prevalenza complessiva (Overall Prevalence) del 63% (ICBayesiano: 59-66%). Nei CORVIDI si osserva la prevalenza più elevata (80%), mentre nei BOVIDI la più bassa (37%). A causa della bassa numerosità campionaria si osservano stime con incertezza molto ampia nei gruppi : LEPRE, ALTRI VOLATILI, UCCELLI ACQUATICI, CARNIVORI e RAPACI. (fig.3)

Su 670 campioni di feci, 92 presentano almeno un ceppo MULTI-RESISTENTE (numero di resistenze  $\geq$  a 3), pari ad una prevalenza del 14% (95%BCI:11%-16%). La prevalenza di animali selvatici portatori di ceppi multiresistenti varia da un minimo del 4% nel gruppo UCCELLI ACQUATICI ad un massimo del 37% nella LEPRE. La bassa numerosità dei campioni di alcuni gruppi specie rende le stime molto incerte(fig.4)

#Per 648 campioni è risultato disponibile il dato geografico e la caratterizzazione #territoriale ISTAT. Su questi campioni è stato possibile quindi valutare la relazione #tra prevalenza di capi selvatici portatori di

ceppi R e di ceppi MR e i caratteri #territoriali di provenienza dei campioni. Per questo tipo di valutazione sono stati #esclusi i dati riferiti ai gruppi specie meno numerosi: LEPRE, UCCELLI ACQUATICI , #ALTRI VOLATILI. Dopo esclusione di questi gruppi specie, il dataset comprendeva informazioni su 628 campioni. Si è proceduto quindi ad eliminare i record con valori Missing sulle seguenti variabili: R (resistenza Si NO), densità di popolazione, e altitudine, ottenendo un dataset di 603 campioni su cui si è proceduto ad effettuare l'analisi dei dati.

I dati Istat disponibili per esplorare l'associazione tra prevalenza di capi portatori di AR e indicatori di "contaminazione" derivati dai singoli comuni sono: densità di popolazione ( da cui deriva la classificazione del grado di urbanizzazione dell'ISTAT), superficie in kmq del comune, altitudine ( correlato alla densità di popolazione e alla classificazione di Montanità dell'ISTAT), superficie a pascolo, numero di capi domestici al pascolo (correlato alla superficie a pascolo), n. aziende al pascolo.

Esistono evidenze in letteratura che la presenza (prevalenza/occorrenza ) di animali selvatici portatori di ceppi AR o MAR è da attribuire alla contaminazione ambientale e/o all'interazione tra specie domestiche e selvatiche. Viene quindi ipotizzata una relazione inversa tra indicatori indiretti di contaminazione ambientale (urbanizzazione, densità di popolazione) e d'interazione tra specie (esempio aree dedicate al pascolo, n. capi al pascolo...ecc... alpeggio...)

Tutte le variabili quantitative predittorie sono state standardizzate in accordo a quanto suggerisce Gelman, sia per una maggior interpretabilità dei coefficienti sia per una migliore performance del motore HCMCM che per una miglior utilizzo delle prior del modello...

La specificazione del modello si è basata su una valutazione DAG, che ha permesso di chiarire la dipendenza delle variabili e scegliere quelle da inserire nel modello.

Mediante il calcolo di WAIC e PSIS ( criteri d'informazione) è stato selezionato un modello multilevel con la variabile "comune" con random effect (cluster di osservazioni) come predittori: Specie, Specie\*Pascolo, Pascolo, Urbanizzazione. Le variabili quantitative sono state preventivamente standardizzate.

Dal modello risulta che la probabilità che un animale della fauna selvatica sia portatore di almeno un ceppo di Enterobacteriaceae resistente ad almeno un ab del panel indagato aumenta all'aumentare della dimensione dell'area adibita a pascolo condizionalmente al gruppo specie di appartenenza, e tende ad aumentare all'aumentare della densità di popolazione per Km<sup>2</sup> con indicatore di urbanizzazione del territorio. In tabella x sono riportate le stime a posteriori dei coefficienti di regressione e i rispettivi intervalli di credibilità.

### 3.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEGLI ISOLATI BATTERICI

La maggior parte dei ceppi (oltre l'80%) ha mostrato resistenza nei confronti di AMP (392 ceppi 42.47%) e TET (342 ceppi 37.05%) in cui si osserva una ampia variabilità nei differenti gruppi di Specie (Fig2).

In particolare, escludendo i ceppi derivati da gruppi specie con ridotta dimensione del campione, la maggior frequenza di ceppi resistenti a AMP si osserva negli isolati del gruppo CORVIDI (58%), del gruppo CERVIDI (45%) e RAPACI (42%); le frequenze minori si osservano nel gruppo BOVIDI (26%) e SUIDI (22%). Le resistenze alle tetracicline sono risultate più frequenti nei ceppi isolati dai CORVIDI (51%) e RAPACI (48%), mentre le più basse in isolati da SUIDI (34%), CERVIDI(32%), BOVIDI(20%).

Nei confronti della COLISTINA, antibiotico di particolare interesse in ambito clinico umano, classificato come. . . . si osserva una bassa frequenza di ceppi resistenti da un minimo dello 0.5% osservato nei ceppi isolati dai SUIDI, ad un massimo del 16% osservato sia nei RAPACI che nella LEPRE. Anche per il CEFTIOFUR , cefalosporina di 3 generazione nei confronti dei quali si è diffusa a livello mondiale la selezione di ceppi ESBL. . . si osserva una bassa prevalenza di ceppi resistenti: minimo 2.1% negli UCCELLI ACQUATICI, massimo 24% nei RAPACI. La GEN risulta l'antibiotico verso cui gli isolati si sono mostrati in modo uniforme tra le differenti specie meno resistenti (12 ceppi 1.30%). Anche per ENR e KAN si osserva una bassa e uniforme prevelenza di ceppi resistenti tra i diversi gruppi specie. (tabella 4)

Il profilo di resistenza tra i differenti generi di ceppi isolati conferma che AMP e TET sono gli antibiotici verso i quali la maggior parte degli isolati mostra la maggior frequenza di resistenze (tabella 5).

Si osservano 39 differenti profili di co-resistenza (da 1 a più AB) (fig.6). I profili più frequenti risultano: TET-AMP (141 ceppi), AMP (130 ceppi), TET (85 ceppi), CFT-TET-AMP (27 ceppi), COL-TET-AMP (14 ceppi), COL-TET (12 ceppi) e CFT-TET (12 ceppi), che rappresentano più dell'80% dei ceppi. Il restante 20% è distribuito nei restanti 32 profili.

Diversità ecologica dei differenti profili di antibiotico-resistenza La figura 6 illustra la distribuzione dei ceppi in base al profilo di co-resistenza e la specie di fauna selvatica da cui provengono. Si può osservare la "rarietà" di molti profili presenti solo in determinati gruppi Specie. Complessivamente si osserva una scarsa uniformità di profili tra i gruppi specie, con una particolare ricchezza di differenti profili nel gruppo CERVIDI e CORVIDI che sono i più rappresentati ma anche nei ceppi isolati dai RAPACI sebbene in numero sensibilmente più ridotto rispetto ai precedenti.

Gli indici di diversità (tab.6)sono riassunti in un grafico di Renyi entropy standardizzato (fig.7). Nella

popolazione di CERVIDI si osserva un profilo di dominanza in termini di diversità con una minore diversità di profili di co-resistenza con una forte dominanza di pochi profili. AL contrario i gruppi specie BOVIDI, SUIDI, CARNIVORI, LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALRI VOLATILI, mostrano un profilo di uniformità (evenness), quindi caratterizzato da maggiore diversità senza la presenza di profili di co-resistenza relativamente dominanti. Le popolazione di CORVIDI e RAPACI mostrano un sovrapponibile profilo di diversità intermedio rispetto a quello di dominanza dei CERVIDI e di evenness degli altri gruppi-specie.

#interazione selvatici-domestici? dati di sondrio confronto (da fare)

Caratterizzazione genomica dei ceppi ceftiofur-resistenti La resistenza dei ceppi isolati al Cefotiofur è risultata poco frequente (prev....)

### **3.4 POOL METAGENOMICI**

#### **4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI (max 10 pagine)**

## 5 BIBLIOGRAFIA

## **6 Raccomandazioni (max 2 pagine)**

**6.0.1** elementi gestionali e/o diagnostici

**6.0.2** indicazioni per la ricerca

**6.0.3** sugg per eventuali provvedimenti normativi

## **7 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)**



## ELENCO FIGURE

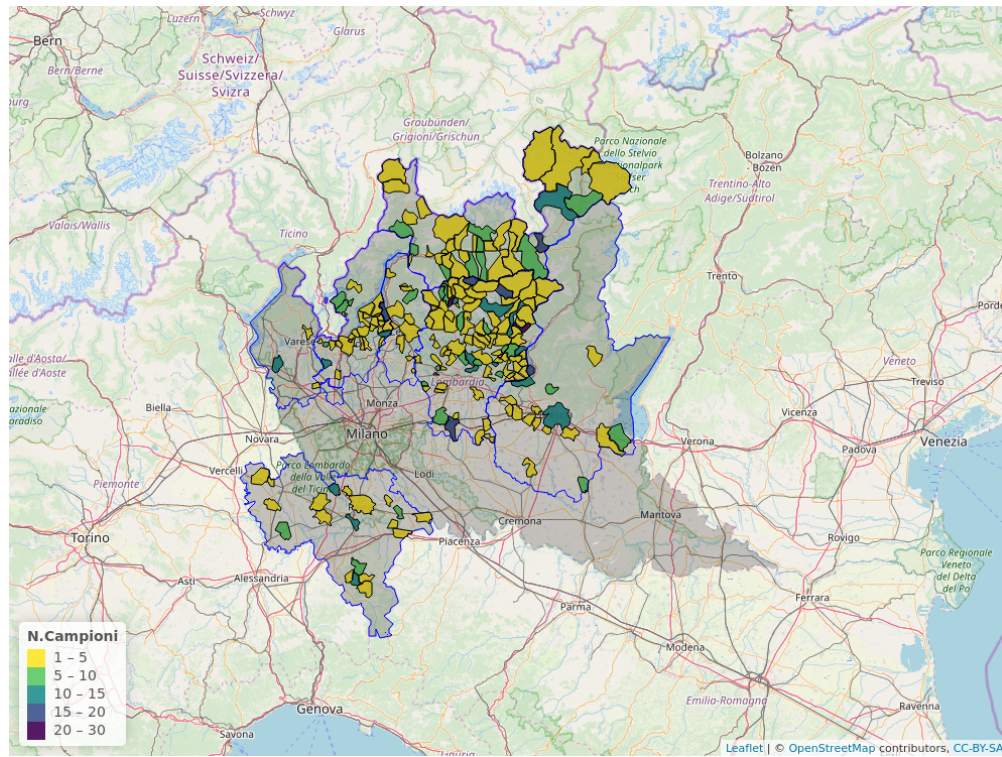


Figura 1: Comuni di provenienza dei campioni

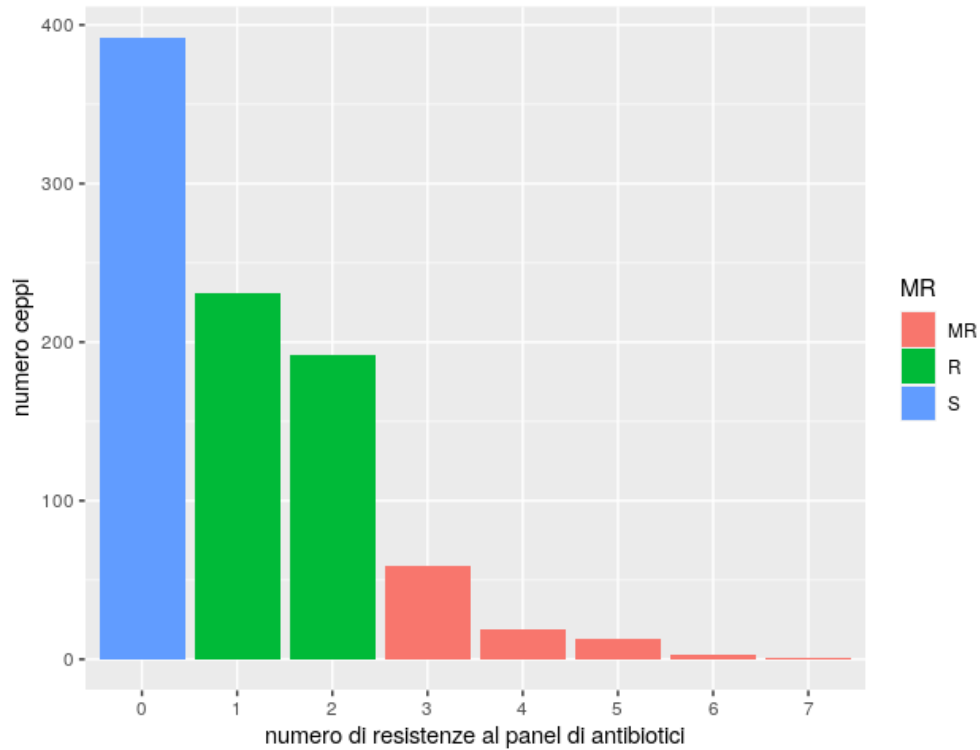


Figura 2: distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici

## ELENCO TABELLE

Tabella 1: Caratterizzazione dei comuni di provenienza dei campioni

Parametri	min	q25	median	q75	max	mean	sd
Superficie (Kmq)	1.97	10.6	17.1	29.2	227	29.8	43.9
Densità di popolazione (Ab/Kmq)	4.02	45.1	128.1	257.1	2210	250.7	357.3
Altitudine mediana	48.00	185.0	600.0	1120.0	2650	773.3	684.6
Superficie al pascolo (ettari)	0.09	11.0	60.0	170.9	2630	178.8	338.8
Aziende con pascolo	1.00	3.0	8.0	16.0	425	12.6	20.3
Capi al pascolo	2.00	52.0	133.0	293.0	8429	307.1	602.7

Tabella 2: Distribuzione del numero e percentuale % del differenti specie di fauna selvatica di origine dei campioni di feci

Gruppo	SPECIE	n	prop
CERVIDI	CAPRIOLO	201	70.53
CERVIDI	CERVO	83	29.12
CERVIDI	DAINO	1	0.35
BOVIDI	CAMOSCIO	49	49.49
BOVIDI	MUFLONE	44	44.44
BOVIDI	STAMBECCO	6	6.06
CARNIVORI	TASSO	5	20.83
CARNIVORI	VOLPE	19	79.17
SUIDI	CINGHIALE	78	100.00
LEPRE	LEPRE	4	100.00
CORVIDI	CORNACCHIA	133	88.67
CORVIDI	GAZZA	13	8.67
CORVIDI	GHIANDAIA	4	2.67
RAPACI	ALLOCCO	3	4.41
RAPACI	ASSIOLO	2	2.94
RAPACI	CIVETTA	15	22.06
RAPACI	CIVETTA NANA	1	1.47
RAPACI	FALCO PECCHIAIOLO	7	10.29
RAPACI	GHEPPIO	13	19.12
RAPACI	GUFO REALE	4	5.88
RAPACI	NIBBIO BRUNO	1	1.47
RAPACI	POIANA	8	11.76
RAPACI	SPARVIERO	14	20.59
UCCELLI ACQUATICI	CIGNO REALE	3	20.00
UCCELLI ACQUATICI	CORMORANO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	FENICOTTERO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	FOLAGA	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO REALE	1	6.67
UCCELLI ACQUATICI	GERMANO REALE	7	46.67
ALTRI VOLATILI	FAGIANO	3	50.00
ALTRI VOLATILI	PICCIONE	2	33.33
ALTRI VOLATILI	STARNA	1	16.67